

16. 1. 2004

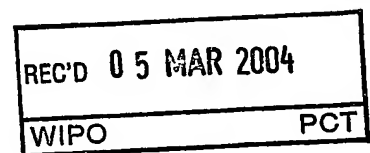
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 1月16日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-008807  
[ST. 10/C]: [JP 2003-008807]



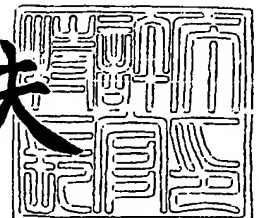
出 願 人  
Applicant(s): 関西ティー・エル・オー株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 88402JP

【提出日】 平成15年 1月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 35/28

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市青山 4 丁目 1 3 - 1 2

【氏名】 小笠原 一誠

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県草津市東矢倉 3 - 3 9 - 2 4 5

【氏名】 梶野 喜一

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市月輪 2 丁目 5 - 3 0 パテオブルーム 2 0 2 号

【氏名】 中村 一郎

【特許出願人】

【識別番号】 899000046

【氏名又は名称】 関西ティー・エル・オー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9912218

【プルーフの要否】 要

**【書類名】 明細書****【発明の名称】 異なる成熟過程を経る骨髄樹状細胞****【特許請求の範囲】**

**【請求項 1】** 以下の (1)、(2) の特徴を有する脱活性化した樹状細胞 (expired dendritic cell; 以下「脱活性化 DC」と略記する。):

- (1) LPS 及び抗 CD40 mAb の作用により成熟型に移行しない
- (2) 未成熟樹状細胞と同様の形状を有する

**【請求項 2】** さらに (3) ~ (7) の少なくとも 1 種の特徴を有する請求項 1 に記載の脱活性化した樹状細胞。

- (3) マイクロビーズに対する食作用活性が未成熟樹状細胞 (immature dendritic cell; 以下「未成熟 DC」と略記する。) と同程度である;
- (4) CD86 の発現レベルが低い (CD86 low);
- (5) IL-10、IL-6 及び TNF $\alpha$  の発現レベルが未成熟 DC よりも高く、これらを放出する。特に免疫抑制性の IL-10 の産生は重要と考えられる。
- (6) MHC クラス I を高発現する
- (7) 抗原ペプチドの存在下で未反応 T 細胞を活性化しない;

**【請求項 3】** 未成熟 DC を抗 CD40 抗体および CD154 を含む少なくとも 1 種の永続的活性化剤とともに処理する工程を含む、永続的に活性化された成熟樹状細胞 (M2 DC) の調製方法。

**【請求項 4】** 未成熟 DC を LPS, CpG を含む一時的活性化剤で活性化する工程を含む、一時的に活性化された成熟樹状細胞 (M1 DC) の調製方法。

**【請求項 5】** 未成熟 DC を LPS, CpG を含む一時的活性化剤で活性化して一時的に活性化された成熟樹状細胞 (M1 DC) に導く工程、該 M1 DC を CD40 リガンドを発現したヘルパー T 細胞を含む永続的活性化剤とともに処理する工程を含む、永続的に活性化された成熟樹状細胞 (M2 DC) の調製方法。

**【請求項 6】** 未成熟 DC を LPS, CpG を含む一時的活性化剤で活性化して一時的に活性化された成熟樹状細胞 (M1 DC) に導く工程、該 M1 DC を永続的活性化剤の非存在下で培養する工程を含む脱活性化された樹状細胞 (expired DC) の調製方法。

【請求項 7】請求項 3 または 5 に記載の方法により調製された永続活性化成熟樹状細胞 (M2DC) を有効成分とする、キラー T 細胞及び／又はヘルパー T 細胞を活性化させる抗ガン剤および抗病原体剤。

【請求項 8】請求項 1 に記載の脱活性化 DC または請求項 6 に記載の方法により得られた脱活性化 DC を有効成分とする免疫抑制剤。

【請求項 9】永続的に活性化された成熟樹状細胞 (M2DC) をガン患者に戻すことを特徴とするガンの治療方法。

【請求項 10】移植ドナー由来の脱活性化 DC をレシピエントに導入し、次いで、移植ドナーの臓器ないし器官をレシピエントに導入することを包含する拒絶反応を抑制した移植方法および自己の脱活性化 DC と抗原を使用したアレルギーおよび自己免疫疾患治療法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脱活性化した樹状細胞、樹状細胞の一時的または永続的成熟方法、これらの樹状細胞を用いた抗ガン剤及び免疫抑制剤、さらにガンの治療方法及び臓器ないし器官の移植方法に関する。

【0002】

なお、本明細書において、樹状細胞 (dendritic cell) を「DC」と略すことがある。

【0003】

【従来の技術及びその課題】

樹状細胞 (DC) は、自然免疫と適応性免疫との間の重要な媒介物質である。炎症に焦点を合わせると、自然免疫に関係するエンドトキシンまたは前炎症サイトカインは、未成熟 DC の成熟 DC への分化を誘導する。後者は、適応性免疫の主要なエフェクター、ヘルパー T 細胞および細胞傷害性 T 細胞を効率的に刺激する (非特許文献 1, 2)。また、活性型 T 細胞上に存在する CD40 リガンド (CD154) による CD40 を介する未成熟 DC への刺激は、DC 成熟のためのシグナルを与える。しかしながら、DC 成熟に関する様々な因子の相対的な重要性

は、依然として不明瞭なままである。骨髓からの未成熟DC調製について記載されるオリジナルの誘発プロトコル通りに、単に細胞のピペティングあるいは再プレーティングするだけでも成熟が引き起こされた（非特許文献3，4）。

【0004】

本発明に関連する公知文献として、さらに非特許文献5～26が挙げられる。

【0005】

本発明は、DCの成熟過程に関する新たな技術を提供することを目的とする。

【0006】

具体的には、本発明は、免疫抑制機能を有する脱活性化した樹状細胞及びその製造方法、並びに免疫賦活機能を有する一時的ないし永続的に活性化された成熟DCの調製方法を提供することを目的とする。

【0007】

また、本発明は、免疫抑制剤、抗ガン剤、ガンの治療方法及び拒絶反応が抑制された臓器、器官の移植方法を提供することを目的とする。

【0008】

【非特許文献1】

Banchereau, J. & Steinman, R.M. Nature 392, 245-252 (1998)

【0009】

【非特許文献2】

Mellman, I. & Steinman, R.M. Cell 106, 255-258 (2001)

【0010】

【非特許文献3】

Inaba, K. et al J. Exp. Med. 191, 927-936 (2000)

【0011】

【非特許文献4】

Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. Nat. Med., 5, 1249-1255 (1999)

【0012】

【非特許文献5】

Nomura, F. et al. J. Immunol. 164, 3476-3479 (2000)

【0 0 1 3】

【非特許文献 6】

Inaba, K. et al. J. Exp. Med. 178, 479-488 (1993)

【0 0 1 4】

【非特許文献 7】

Wang, Y. et al. Immunity 15, 971-983 (2001)

【0 0 1 5】

【非特許文献 8】

Stoll, S. et al. Science 296, 1973-1876 (2002)

【0 0 1 6】

【非特許文献 9】

Ingulli, E. et al. J. Immunol. 169, 2247-2252 (2002)

【0 0 1 7】

【非特許文献 1 0】

Lee, B. O. et al. J. Exp. Med. 196, 693-704 (2002)

【0 0 1 8】

【非特許文献 1 1】

Ridge, J. P. et al. Nature 393, 474-478 (1998)

【0 0 1 9】

【非特許文献 1 2】

Bennett, S. R. et al. Nature 393, 478-480 (1998)

【0 0 2 0】

【非特許文献 1 3】

Schoenberger, S. P. et al. Nature 393, 480-483 (1998)

【0 0 2 1】

【非特許文献 1 4】

Hawiger, D. et al. J. Exp. Med. 194, 769-779 (2001)

【0 0 2 2】



## 【非特許文献 1 5】

Hugues, S. et al. Immunity 16, 169-181 (2002)

【 0 0 2 3】

## 【非特許文献 1 6】

Jonuleit, H. et al. J. Exp. Med. 192, 1213-1222 (2001)

【 0 0 2 4】

## 【非特許文献 1 7】

Liu, K. et al. J. Exp. Med. 196, 1091-1097 (2002)

【 0 0 2 5】

## 【非特許文献 1 8】

Albert, M. L. et al. Nat. Immunol., 2, 1010-1017 (2001)

【 0 0 2 6】

## 【非特許文献 1 9】

Greisman, S. E. et al. J. Exp. Med. 124, 983-1000 (1966)

【 0 0 2 7】

## 【非特許文献 2 0】

Wysocka, M. et al. J. Immunol. 166, 7504-7513 (2001)

【 0 0 2 8】

## 【非特許文献 2 1】

Alves-Rosa, F. et al. Clin. Exp. Immunol. 128, 221-228 (2002)

【 0 0 2 9】

## 【非特許文献 2 2】

Inaba, K. et al J. Exp. Med. 176, 1693-1702 (1992)

【 0 0 3 0】

## 【非特許文献 2 3】

Stordeur, P. et al. J. Immunol. Method. 259 55-64 (2002)

【 0 0 3 1】

## 【非特許文献 2 4】

Corbela, P. et al. Immunity 1, 269-276 (1994)

## 【0032】

## 【非特許文献25】

Sykulev, Y. et al. Proc Natl. Acad. Sci. U S A 91, 11487-11491 (1994)

## 【0033】

## 【非特許文献26】

Murphy, K. A. et al. Science 250, 1720-1723 (1990)

## 【0034】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記のようなピペティングおよび再プレーティングを行わずに、エンドトキシン (LPS)、抗-CD40モノクローナル抗体 (mAb) (CD154の代わりとして)、またはTNF $\alpha$  (前炎症サイトカインとして) を用いて、CD8<sup>+</sup>骨髄性DCの成熟を評価した。

## 【0035】

本発明者は、リポ多糖類 (LPS) レセプターを含むToll様レセプター (TLRs) を介する刺激によって誘導される、骨髄性DCの急速な成熟 (CD8<sup>6</sup>high、MHCクラスII<sup>high</sup>表現型によって特徴づけられる) およびそれに続く脱活性化 (CD8<sup>6</sup>low、MHCクラスII<sup>low</sup>表現型によって特徴づけられる) について記載する。この脱活性化DCは、高レベルなMHCクラスII発現、多量なIL-10/TNF $\alpha$ 産生、および別の方法で成熟を誘導する刺激に対する非反応性を除いて、多くの点で未成熟DCに類似している。このような脱活性化DCは、未反応の細胞傷害性T細胞 (CTL) を刺激することができない；むしろ、それらはCTLクローンにおいてアナジーを誘導した。DC40を介する刺激は、脱活性化表現型へのLPS誘導型移行を阻害し、結果的にLPS刺激後の初期段階においてみられる表現型とは異なる成熟表現型の獲得をもたらした。

## 【0036】

本発明者はまた、未成熟DCがTLRを介して局所刺激を受けた後に、所属リンパ節に移行して、ここで活性型ヘルパーT細胞と相互作用することによって、成熟表現型の維持がもたらされることを観察した。これらのデータに基づいて、本発明者は、免疫調節に関係するDC成熟の新たな技術を提唱する。DC成熟過

程の詳細を明らかにしたのは本発明者が初めてである。

【0037】

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

項1. 以下の(1)、(2)の特徴を有する脱活性化した樹状細胞(expired dendritic cell; 以下「脱活性化DC」と略記する。):

(1) LPS及び抗CD40 mAbの作用により成熟型に移行しない

(2) 未成熟樹状細胞と同様の形状を有する

項2. さらに(3)～(7)の少なくとも1種の特徴を有する項1に記載の脱活性化した樹状細胞。

(3) マイクロビーズに対する食作用活性が未成熟樹状細胞(immature dendritic cell; 以下「未成熟DC」と略記する。)と同程度である;

(4) CD86の発現レベルが低い(CD86<sup>low</sup>);

(5) IL-10、IL-6及びTNF $\alpha$ の発現レベルが未成熟DCよりも高く、これらを放出する。特に免疫抑制性のIL-10の産生は重要と考えられる。

(6) MHCクラスIを高発現する

(7) 抗原ペプチドの存在下で未反応T細胞を活性化しない;

項3. 未成熟DCを抗CD40抗体およびCD154を含む少なくとも1種の永続的活性化剤とともに処理する工程を含む、永続的に活性化された成熟樹状細胞(M2DC)の調製方法。

項4. 未成熟DCをLPS, CpGを含む一時的活性化剤で活性化する工程を含む、一時的に活性化された成熟樹状細胞(M1DC)の調製方法。

項5. 未成熟DCをLPS, CpGを含む一時的活性化剤で活性化して一時的に活性化された成熟樹状細胞(M1DC)に導く工程、該M1DCをCD40リガンドを発現したヘルパーT細胞を含む永続的活性化剤とともに処理する工程を含む、永続的に活性化された成熟樹状細胞(M2DC)の調製方法。

項6. 未成熟DCをLPS, CpGを含む一時的活性化剤で活性化して一時的に活性化された成熟樹状細胞(M1DC)に導く工程、該M1DCを永続的活性化剤の存在下で培養する工程を含む脱活性化された樹状細胞(expired DC)の調製方法。

項 7. 項 3 または 5 に記載の方法により調製された永続活性化成熟樹状細胞 (M2DC) を有効成分とする、キラー T 細胞及び／又はヘルパー T 細胞を活性化させる抗ガン剤および抗病原体剤。

項 8. 項 1 に記載の脱活性化 DC または項 6 に記載の方法により得られた脱活性化 DC を有効成分とする免疫抑制剤。

項 9. 永続的に活性化された成熟樹状細胞 (M2DC) をガン患者に戻すことを特徴とするガンの治療方法。

項 10. 移植ドナー由来の脱活性化 DC をレシピエントに導入し、次いで、移植ドナーの臓器ないし器官をレシピエントに導入することを包含する拒絶反応を抑制した移植方法および自己の脱活性化 DC と抗原を使用したアレルギーおよび自己免疫疾患治療法。

#### 【0038】

##### 【発明の実施の形態】

本発明では、未成熟 DC が以下の 3 種のいずれかの経路で変換 (分化) される。

経路 1: 未成熟 DC → M1DC → 脱活性化 DC (expired DC)

経路 2: 未成熟 DC → M1DC → M2DC (タイプ 1)

経路 3: 未成熟 DC → M2DC (タイプ 2)

経路 1、2 において、未成熟 DC から M1DC へは、一時的活性化剤により誘導される。

#### 【0039】

経路 2 において、M1DC から M2DC (タイプ 2) への誘導及び経路 3 において、未成熟 DC から M2DC (タイプ 1) への誘導は、永続的活性化剤により実施される。

#### 【0040】

経路 1 において、M1DC から脱活性化 DC への移行は、特別な物質は必要なく、通常の培養液中 (但し、永続的活性化剤は含まない) で 24～48 時間程度培養することで、行うことができる。

#### 【0041】

未成熟DCは、骨髄細胞や、未成熟樹状細胞になり得る幹細胞を適切な誘導剤を用いて誘導して調製してもよいし、或いは脾臓から直接未成熟DCを得ることもできる。たとえば骨髄細胞にGM-CSFを作用させることで、未成熟DCに導くことが可能である。

#### 【0042】

永続的活性化剤は、未成熟DCまたはM1DCから永続的に活性化された成熟DC (M2DC) に導くことができる活性化剤であれば特に限定されず、例えば抗CD40抗体 (ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む)、CD154、TNF $\alpha$ などが例示され、好ましくは抗CD40モノクローナル抗体が例示される。

#### 【0043】

一時的活性化剤は、未成熟DCから一次的に活性化された成熟DC (M1DC) に導くことができる活性化剤であれば特に限定されず、例えば、LPS、CpG、ペプチドグリカン、壊死細胞成分等のToll-like receptors (TLRs) に結合し、活性化シグナルを誘導するものなどが例示される。

#### 【0044】

脱活性化DCが「未成熟DCと同様の形状を有する」とは、具体的には、図2aに示されるように脱活性化DCは集塊をほとんど或いは全く形成せず、球形、楕円型、菱形等の形状を有する付着細胞であり、とげ状の樹状形状及びクラスター形成が少ないことを意味する。このとげ状の樹状形状およびクラスター形成の程度は、CD86発現量と比例していると考えられる。

#### 【0045】

また、「CD86の発現レベルが低い (CD86<sup>low</sup>) 」とは、色素物質 (例えばフィコエリトリン) または蛍光物質 (FITCなど) 等のマーカーを結合した抗CD86抗体を使用し、脱活性化DCと反応させると、コントロール (脱活性化DCのみを用い、マーカー結合抗CD86抗体を使用しない) に比べて10倍以下 (通常1~10倍、特に3~8倍程度) の吸光度または蛍光強度を有する。なお、「CD86の発現レベルが高い (CD86<sup>high</sup>) 」M1DC、M2DCでは、脱活性化DCに対し10~100倍程度、特に50~100倍程度 (コン

コントロールに対し50～800倍、特に200～500倍程度)の吸光度または蛍光強度を有する。

#### 【0046】

本発明の脱活性化DCは、未成熟DCと同様の形状を有し、CD86の発現レベルが低い点並びにマイクロビーズに対する食作用を有する点でも未成熟DCに類似するが、以下の点で、未成熟DCと異なっている：

- (i) LPSなどの一時的活性化剤および抗CD40 mAbなどの永続的活性化剤を作用させても成熟DC (M1DCまたはM2DC)に移行しない；
- (ii) IL-10、IL-6及びTNF $\alpha$ の発現レベルが未成熟DCよりも高く、これらを放出する。特に免疫抑制性のIL-10の産生は重要と考えられる。

#### 【0047】

- (iii) MHCクラスI (MHCクラスI／ペプチド複合体)を高発現する
- (iv) 未反応T細胞を活性化しない；
- (v) TLR4／MD2が、未成熟DCよりも低い

なお、脱活性化DCは、塊を形成しない楕円型の付着細胞であり、樹状突起のクラスターが少なく、未成熟DCと類似した外観を呈するが、M1DC、M2DCは集塊を形成し突起が出現する点で、これらは明瞭に区別できる。

#### 【0048】

「CD86の発現レベルが低い (CD86<sup>low</sup>)」とは、コントロールとくらべて約数倍 (10倍以下、特に3～8倍)の蛍光強度を示すものを指し、CD86-highとはCD86-lowとくらべて約数十倍の蛍光強度を示すものを指す。

#### 【0049】

未成熟DCは、CD86を発現していないので、レシピエントに導入された場合にキラーT細胞及びヘルパーT細胞のアナジーを誘導する可能性があるが、未成熟DCはレシピエント内で活性化されて成熟DC (M1DC, M2DCなど)になって、免疫系を賦活する可能性が高い。

#### 【0050】

一方、脱活性化DCは再び成熟DCに戻ることはなく、安定している。従って、ドナーの脱活性化DCをレシピエントに予め投与するとドナー移植片を拒絶可

能なレシピエントのキラー T 細胞及びヘルパー T 細胞の両方にアナジー (anergy) 誘発し、次にドナーの臓器ないし器官等を移植した場合に、拒絶反応を抑制することが可能となる。本発明の脱活性化 DC が免疫拒絶を抑制することは、MLC 法 (mixed Lymphocyte reaction culture) により確認することが可能である。具体的には、ドナーとレシピエント (脱活性化 DC 投与前) の脾臓組織の一部を取り出し、該組織の脾臓細胞を混合培養したとき、T 細胞数が増加するが、レシピエントにドナー由来の脱活性化 DC を投与してレシピエントのキラー T 細胞、及び任意にヘルパー T 細胞のアナジーを誘発し、次に MLC 法を行った場合には T 細胞数が増加しないことから、ドナー由来の脱活性化 DC がレシピエントの免疫拒絶を抑制することが確認できる。データは示さないが、本発明者は、ドナー由来の脱活性化 DC をレシピエントに投与後に、ドナーの骨髄をレシピエントに移植すると、MLC 反応が起こらなかったことを確認している。

#### 【0051】

該移植される臓器ないし器官等としては、心臓、肝臓、腎臓、肺、小腸、脾臓等の臓器、さらに骨髄が例示される。

#### 【0052】

さらに、脱活性化 DC は移植拒絶の抑制だけでなく、アレルギー、自己免疫疾患の治療剤としても有効である。

#### 【0053】

M2 DC は、経路 2 と経路 3 のいずれかにより未成熟 DC から調製することが可能であり、経路 2 により調製された M2 DC (タイプ 1) は経路 3 により調製された M2 DC (タイプ 2) よりも IL-12p40 の発現量が有意に大きい点で、両者は異なっている。従って、M2 DC (タイプ 1) はより免疫増強効果が強いと考えられる。

#### 【0054】

不安定な M1 DC とは異なり、M2 DC は安定であって脱活性化 DC に移行しない。従って、例えばガン患者から得た未成熟 DC (骨髄細胞から誘導されたものを含む) を経路 2 または 3 に従い M2 DC に誘導し (タイプ 1 はより有効)、この M2 DC をガン患者に戻すことにより、ガン患者のキラー T 細胞及びヘルパ

ーT細胞を活性化し、それによりガンの予防及び治療を行うことが可能になる。  
さらに、各種病原体（A型、B型ないしC型肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス等）に対する抗病原体剤としても有効である。病原体は、病原体由来のペプチドさえあれば、その種類を問わない。

#### 【0055】

##### 【発明の効果】

本発明者は、本明細書において、LPS刺激後の骨髄性DCの急速な成熟およびそれに続く脱活性化（*expiraton*）について記載した。脱活性化したDC（*expired DC*）は、高レベルなMHCクラスI発現および大量のIL-10/TNF $\alpha$ 産生を除いて、未成熟DCに似ている。このような脱活性化DCは、未反応のCTLを刺激することができず、むしろCTLクローンにおいてアナジーを誘導した。CD40を介する刺激は、脱活性化表現型へのLPS誘導型移行を阻害し、結果的にLPS刺激後の初期段階においてみられる表現型とは異なる成熟表現型の獲得をもたらした。このことはまた、生体内においても観察された。

#### 【0056】

これらの結果は、免疫調節への新たな手段を提供するものである。

#### 【0057】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例に従って説明するが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例 1

##### （I）新規DCサブセットの検出

DC成熟を時間をおって観察し、本発明者は、LPS刺激の8時間後ほとんど全てのDCがCD86発現の急速な増加を伴って応答することを見出した。これとは対照的に、抗-CD40 mAb刺激およびTNF $\alpha$ 刺激は、CD86<sup>high</sup>集団のより緩やかな増加を誘導した。興味深いことに、CD86の初期の急速なアップレギュレーションにも関わらず、多数のCD86<sup>low</sup>細胞が、LPS刺激の24時間後に依然として存在していた（図1a）。私達は、LPS刺激型DC



におけるCD86<sup>low</sup>集団がCD11c<sup>+</sup>CD86<sup>high</sup>集団に由来する否かを試験するために、LPS刺激の6時間後、磁気選別、それに続く完全洗浄、そしてLPSもしくは抗-CD40 mAbを用いる24時間のインキュベーションによって、CD11c<sup>+</sup>細胞をDCから精製した。このように準備されたCD11c<sup>+</sup>細胞のほとんど全てが、その細胞表面上で高レベルな（ピークには達していなかったが）CD86を発現していた。二次培養物中にLPSが存在するか否かに関わらず、ほとんどのCD11c<sup>+</sup>細胞がCD86の高密度な表面発現を消失した。しかしながら興味深いことに、二次培養物中における抗-CD40 mAbの存在下においては、多数のCD11c<sup>+</sup>細胞が依然としてCD86<sup>high</sup>であった（図1b）。培養中に観察される細胞数の変化が微々たるものであったことを考慮すると、この観察の説明として、LPS刺激後24時間以内にCD86<sup>high</sup>DCが大量細胞死した可能性を引き合いに出すことは困難である。従って、LPSがDC上のCD86の急速なアップレギュレーションおよびそれに続くダウンレギュレーションを24時間以内に引き起こした可能性が高い。

#### 【0058】

次に、2種類のDC表現型（すなわち、抗-CD40 mAbによってアップレギュレーションされるCD86またはLPSによってダウンレギュレーションされるCD86）の安定性を検証した。そこで、これら2種類のDCサブタイプを、LPSまたは抗-CD40 mAbによって2次刺激した。しかしながら、どちらの表現型も再び変化することはなかった（図1c）。これらのデータは以下の4つの結論を与える。

- (1) LPSは骨髓性DCの一時的かつ不安定な成熟を誘導する。
- (2) その後、LPS刺激はCD86<sup>low</sup>表現型を有する安定なDC集団を産生する。
- (3) CD40刺激は、CD86のLPS誘導型ダウンレギュレーションを阻害する効果を発揮する。
- (4) 抗-CD40 mAb誘導型CD86<sup>high</sup>DCは、比較的安定な表現型のDCである。

#### 【0059】

上記のデータに基づいて、本発明者は、骨髄性DCの成熟を4つのカテゴリーに分類した:

(1) 未成熟DC:

新しく分化されて刺激を受けていないCD86<sup>low</sup>表現型。

(2) 第1段階の成熟DC (M1DC):

LPS刺激後、初期の一時的なCD86<sup>high</sup>表現型。

(3) 第2段階の成熟DC (M2DC):

抗-CD40刺激後の安定なCD86<sup>high</sup>表現型。

(4) 脱活性化DC:

LPS刺激後、後期におけるCD86<sup>low</sup>表現型。

これら4種類のDC表現型の形態学的評価によって、樹状形状およびクラスター形成がCD86発現と相互関係にあることが明らかになった。凝集されたM1DCが外見上とげ状 (spiny) であるのに対し、脱活性化DCにおいては、樹状突起の減少を伴ってこれらのクラスターが減少し、視覚的に未成熟DCを思わせる外見を有していた。M2DCもまた、突出した樹状突起を有する固体クラスターを形成した (図2a)。LPS刺激の48時間後には、ほとんど全てのCD86<sup>high</sup>表現型M1DCがCD86<sup>low</sup>脱活性化DC表現型を獲得していたが、その集団の中でも少数のCD86<sup>high</sup>DCが依然として残存していた。

(II) DCサブセットの表現型の相違

次に、未成熟DCおよび脱活性化DCがCD86発現および形態学の両方において非常に類似しているように思われたので、それらの間の相違点を搜した。抗-CD40 mAbを用いる刺激の6時間後のDC (未成熟DC) とLPSを用いる刺激の24時間後のDC (脱活性化DC) との間の表面マーカー発現の比較によって、MHCクラスIの発現レベルが両者を識別するマーカーを表すことが実証された (図2b)。さらに、M1DCおよびM2DCは、FcγRII/IIIの発現レベルによって識別された。さらに、本発明者は、脱活性化DCのLPSに対する非反応性に基づいて、LPSレセプター (TLR4/MD2) がこれらの細胞においてダウンモジュレーションされるという仮説を立てた (Nomu

ra, F. et al. J. Immunol. 164, 3476-3479 (2000))。予測した通り、未成熟 DC は、脱活性化 DC よりも高い TLR 4/MD 2 発現を示した (図 2 c)。また、FITC 標識化マイクロビーズを使用して、脱活性化 DC の食作用活性を試験した (図 2 d)。一般的に、活性型 DC は抗原を捕捉することができないと考えられている (Inaba, K. et al J. Exp. Med. 178, 479-488 (1993))。しかしながら、脱活性化 DC は、すでに活性化されているにもかかわらず、未成熟 DC と同じくらい効率的にビーズを捕捉した。対照的に、M2 DC 集団における細胞のほとんどが、マイクロビーズを捕捉し得なかった。

#### 【0060】

4つのDCサブタイプ間の相違点をさらに同定するために、分類された細胞のサイトカインRNAaseプロテクションアッセイを行った。LPS刺激型DC (M1 DCおよび脱活性化DC) 2つのサブセットは、非常に良く似たサイトカインmRNAパターンを示した。脱活性化DCにおいて、IL-1およびIL-6はアップレギュレーションされたが、IL-12p40シグナルは弱かった。対照的に、M2 DCは、全く異なるパターン (すなわちIL-12p40およびIL-6のアップレギュレーション、反対にIL-1およびIL-1Raのダウンレギュレーション) を有した (図3a)。サイトカイン産生をより正確に比較するために、4つのDCサブセットおよびLPSに次いで抗-CD40 mAbで連続的に刺激されたDCのIL-6およびIL-10ならびにTNF $\alpha$ のmRNAの相対的コピー数を、リアルタイムな定量的PCRによって測定した。LPS刺激の後、IL-6、IL-10およびTNF $\alpha$ は、M1 DCにおいてアップレギュレーションされ、次いで脱活性化DCにおいてわずかにダウンレギュレーションされたのに対して、M2 DCにおけるIL-6のアップレギュレーションはほとんど検出されず、TNF $\alpha$ およびIL-10の低レベルな発現が検出された (図3b)。抗-CD40を用いた刺激によってM1 DCから誘導されたCD86<sup>high</sup>成熟DCは、M2 DCに対してほとんど同じサイトカインプロファイルを示し、抗-CD40刺激が主にM1 DCからM2 DCへのシフトを媒介するという概念が支持された。これらの異なるサイトカイン産生プロファイルは、4種類のDCサブセットを明瞭に区別する。

## 【0061】

M2DCおよび脱活性化DCによるMHCクラスI発現のレベルは非常に似ているので、本発明者は、異なるDCサブセットのCTL活性化の能力を比較した。F5トランスジェニックマウス由来の未反応CD8<sup>+</sup>T細胞（ここで、このT細胞はインフルエンザ核タンパク質（NP）366-374特異的Db-特異的抗原レセプターである）を、数種類の濃度のNPペプチドを加えた3種類のDCサブセット（すなわち、未成熟DC、M2DCおよび脱活性化DC）と共に培養した。私達は、M1DCの表現型が暫定的であるので、M1DCが機能的アッセイにおける使用に適していないと考えた。未成熟および脱活性化DCが未反応T細胞を活性化し得ないということが見出されたのに対して、M2DCは、100 pM以上のNP366-374濃度でCTLを活性化した（図4a）。

## 【0062】

次いで、脱活性化DCがT細胞アナジを誘導し得るか否かを試験した。

## 【0063】

OVA<sub>257-264</sub>（オボアルブミン（OVA）由来のペプチド）に特異的なT細胞クローン（4G3）は、脱活性化DCおよびOVA<sub>257-264</sub>と共に48時間培養され、次いでB6脾臓細胞および種々の濃度のOVA<sub>257-264</sub>と共に再び培養された。これらの4G3細胞は、ConA培養上清にはなお応答し得たものの、いずれの試験濃度のOVA<sub>257-264</sub>にももはや応答しなかった。このことは、脱活性化DCがアナジを誘導し得ること示している。

## (III) DC成熟の新規モデル

これらのデータに基づいて、本発明者は、CD40を介するシグナル伝達の非存在下ではM1DCから脱活性化DCへ至り、CD40を介するシグナルを受けると、安定な成熟型（M2DC）へと分化するというモデルを提案する（図5c）。その結果、CD40刺激は、CTLの寛容化に反して活性化するための選択において極めて重要な役割を果たすことが判明した。一方で、ミコバクテリアの熱ショックタンパク質70がCD40を介して単球誘導型DCを刺激することが報告されていることから、未成熟DCがCD40刺激を介して直接的にM2DCへとシフトする経路が存在し得ることを無視することはできない（Wang, Y. et

al. *Immunity* 15, 971-983 (2001))。このモデルによって、すでに出版された報告 (Stoll, S. et al. *Science* 296, 1973-1876 (2002); Ingulli, E. et al. *J. Immunol.* 169, 2247-2252 (2002); Lee, B. O. et al. *J. Exp. Med.* 196, 693-704 (2002)) を参考にして、生体内における以下のシナリオが予測される。炎症に焦点を置くと、未成熟 DC は、抗原を捕捉し、TLR もしくは前炎症リンフォカインレセプターを介して M1 DC への分化を引き起こすシグナルを受け取る。M1 DC は、それらがヘルパー T 細胞表面上での CD40L 発現を誘導する所属リンパ節へ迅速に移動する。この一連の事象は、一般的に 12 時間以内に成し遂げられる。従って、活性型ヘルパー T 細胞は CD40 を介してシグナルを M1 DC に与え、その結果、脱活性化 DC への最終的変化が起こる前に、CTL を活性化し得る M2 DC への分化が生じる。CD40 と CD40L との間の相互作用が失敗すると、CTL を寛容化する脱活性化 DC への移行が誘導される (図 5 c)。生体内でこれを確かめるために、LPS によって誘導された CFDA-SE 標識化 CD11c<sup>+</sup>M1 DC に OVA323-336 (これは、DO11.10 マウスにおいてヘルパー T 細胞を活性化する) を加えて、DO11.10 マウスに接種した。2 日後、所属リンパ節および脾臓内の CFSE 陽性細胞について CD86 発現を分析した。リンパ節において OVA323-336 を加えた DC のみが CD86 を高レベルで発現したのに対して、脾臓におけるほとんどの DC は、OVA ペプチドの存在の有無に関わらず、未成熟/脱活性化表現型の DC であった (図 5 a)。それゆえ、M1 DC は、特にリンパ節において、ヘルパー T 細胞と相互作用した後 M2 DC へ進行すると考えられる。

#### 【0064】

最後に、本発明者は、M1 DC の脱活性化が一般的な現象であるか否かを調べた。ペプチドグリカン (TLR2 リガンド)、CpG ODN (TLR9 リガンド)、および壊死細胞 (内因性活性化因子で、自己物質に由来する天然のアジュバンドの形状であると考えられている; Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. *Nat. Med.*, 5, 1249-1255 (1999)) を未成熟 DC と共に 6 もしくは 48 時間培養した。抗-CD40 mAb は、48 時間後に DC 上で CD86 の高レベル発現を誘導したが、6 時間後には誘導しなかった (図 1 に示されるのと同様

に)。それとは対照的に、ペプチドグリカン、CpG ODN、および壊死細胞は、6時間後に強いCD86発現を誘導したが、48時間後にはほとんどの細胞において明らかに発現されず、LPS刺激型DCの場合も同様であった(図5b)。これらのデータは、ここに提唱した成熟モデルがDC成熟の主要な生理学的経路であることを示す。

#### (IV) 考察

本発明の新たな成熟DCモデルは、いくつかの長年の疑問を解決し得る。第1に、なぜDCを誘導する全ての試薬のうち抗-CD40 mAb (もしくはCD154) のみがCTL活性化を顕著に特徴づけるのかである(Ridge, J. P. et al. Nature 393, 474-478 (1998); Bennett, S. R. et al. Nature 393, 478-480 (1998); Schoenberger, S. P. et al. Nature 393, 480-483 (1998))。本発明者は、CTL誘導におけるCD40刺激の本当の役割は成熟DC表現型の継続的な安定性の維持であると考えている。実際、MHCクラスII/ペプチド複合体およびMHCクラスI/ペプチド複合体の発現が、LPS刺激後それぞれ約8時間および24時間で検出された(未発表の研究)。M1DC表現型は初期段階において短時間だけ存在しているので、MHCクラスI/ペプチド複合体の発現レベルはこの段階ではCTL活性化に必要とされるレベルにまで達することができない。脱活性化DCもまた、十分なレベルのMHCクラスI/ペプチド複合体の保持にも関わらず、CD86およびIL-12をほとんど発現しないために、CTL活性化能力を有さない。CD40刺激の24時間後に達成されるM2DCのみが、MHCクラスI/ペプチド複合体をCTLに提示することができた。総合すると、M1DCおよびM2DCの主な役割は、それぞれヘルパーT細胞およびCTL (もしくはヘルパーT細胞) を活性化することである可能性がある。

#### 【0065】

第2に、「未成熟DCは単独でCTL寛容化を誘導することができるのか？」である。本発明者は、脱活性化DCが未成熟DCと機能的にほぼ同一である寛容誘発DCの候補となり得ることを表現型および機能的に同定した。未成熟DCは寛容を生じる効果を発揮し得ると信じられている(Hawiger, D. et al. J. Exp. Med. 194, 769-779 (2001); Hugues, S. et al. Immunity 16, 169-181 (2002))。

2); Jonuleit, H. et al. J. Exp. Med. 192, 1213-1222 (2001); Liu, K. et al. J. Exp. Med. 196, 1091-1097 (2002))。しかしながら、Albertら (Albert, M. L. et al. Nat. Immunol., 2, 1010-1017 (2001)) は、CD8<sup>+</sup>T細胞の交差寛容化の誘導にDC成熟が必要であることを実証した。さらに、DCのCD40刺激は、交差寛容化ではなく交差活性化の結果を決定づけた。本発明者のモデルは、おそらくこれらの研究を説明する。さらに、脱活性化DCは、免疫応答を減少させる能力 (IL-10産生を含む) に帰因する様々な特徴を有している。従って、このサブセットは、抗原特異的免疫応答の調節に有用であり得る。

### 【0066】

最後に、エンドトキシン寛容のメカニズムは何であるかについて説明する。エンドトキシン寛容 (Greisman, S. E. et al. J. Exp. Med. 124, 983-1000 (1966)) (エンドトキシン (LPSを含む) への継続的な暴露によって誘導される) は、おそらく、CD40を介する刺激の非存在下で起こる急速な表現型の変化 (M1DCから脱活性化DCへの) によって説明される。この概念は、脱活性化DCにおけるTLR4/MD2のより低レベルな発現 (図2b) によって、部分的に支持される。さらに、いくつかの他の報告 (Wysocka, M. et al. J. Immunol. 166, 7504-7513 (2001); Alves-Rosa, F. et al. Clin. Exp. Immunol. 128, 21-228 (2002)) (IL-12産生が実験的エンドトキシン寛容の間に抑制されること、およびIL-1 $\beta$ がエンドトキシン寛容に関係していること) で述べられている研究はまた、脱活性化DCのサイトカインプロファイルによっても説明される。同様に、大量壊死および重篤な感染 (たとえば、エンドトキシンショック) においては、非常に多くのM1DCが存在するため、ヘルパーT細胞が全てのM1DCをM2DCへと分化させることはできない。これらは、結果的に、脱活性化DCの増加およびそれに対応する免疫不全の現象をもたらす。総じて、ここで定義されるDCサブセットは、免疫応答の調節に深く関係していると結論づけられる。

### 実施例2

#### (I) 骨髄性DCの産出

DCは前述のようにマウスの骨髄より産出した (Inaba, K. et al J. Exp. Med. 176, 1693-1702 (1992))。簡単には、C57BL/6J、BALB/cCrもしくはB6C3F1マウス (SLC) の骨髄細胞から、特異的な抗体および補体を用いてT細胞、B細胞および顆粒球を除いた後に、10% FCS、4 ng/ml 組み換えマウス顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子 (rmGM-CSF) (Kirin Brewery Co. Ltdにより提供された) および50  $\mu$ M  $\beta$ -メルカプトエタノールを補ったRPMI 1640 (Nacalai Tesque) 中で、24ウェル培養プレートにて6日間培養した。培養培地は、2日に1回新鮮な培地と交換した。DCの成熟は、5  $\mu$ g/ml 抗-CD40 mAb (NM40-3)、1  $\mu$ g/ml LPS (E. coli由来) (Nacalai Tesque)、1  $\mu$ g/ml ペプチドグリカンIII型 (S. aureus由来) (Wako)、0.1  $\mu$ M ホスホチオアート保護化CpG ODN (5'-TCCATGACGTTCTTGATGTT-3'、Hokkaido System Science) もしくは凍結および解凍された $1 \times 10^5$  COS-7細胞 (壊死細胞として) からの派生物を、各々の培養ウェルへ添加することによって誘導された。

#### (II) フローサイトメトリー

DCを抗-Fc $\gamma$ RII/III mAb (2.4G2) で処理し、次いでフルオレセイン (FITC) 結合型の抗-CD11c、フィコエリトリン (PE) 結合型の抗DC86もしくはI-A<sup>k</sup>、およびビオチン結合型のハムスター抗-IgG、I-K<sup>k</sup> (BD Pharmingen) またはTLR4/MD2 (eBioscience) を用いて染色し、ストレプトアビジン-PEを行った。染色された細胞は、FACScanを用いて得た (Becton Dickinson Immunocytometry System)。

#### 【0067】

結果を図2bに示す。

#### (III) 食作用アッセイ

FITC標識された2  $\mu$ m 樹脂マイクロビーズ ( $5 \times 10^6$ ) (Sigma) を、FACSVantage (Becton Dickinson Immu



n o c y t o m e t o r y   S y s t e m) を用いて分類された未成熟DC、M2DCもしくは脱活性化DC ( $1 \times 10^5$ ) と共に、共培養した。8時間インキュベーションした後、各々のDCをFACS分析にかけた。

#### (IV) RNaseプロテクションアッセイ (RPA)

製造業者のプロトコルに従ってRNA単離キット (R o c h e   D i a g n o s t i c s) を使用し、各DCサブセットから細胞の全RNAを単離した。mCK-2bプローブセットと共にRiboQuant kits (B D   P h a r M i n g e n) を使用して、サイトカインmRNAのレベルをRPAによって検出した。簡単には、FACS Vantageによって分類された各DCサブセットの全RNA ( $2 \mu\text{g}$ ) を、 $56^\circ\text{C}$ にて16時間、 $[\alpha-^{32}\text{P}]$  UTP標識化アンチセンスリボプローブにハイブリダイゼーションさせた。RNase Aおよびプロテイナーゼ Kによって消化した後、保護されたRNAフラグメントを変性シーケンスゲル上で分離し、オートラジオグラフィーを行った。

#### (V) RT-PCR

全RNA ( $0.5 \mu\text{g}$ ) をcDNA合成に用いた。逆転写 (RT) は、業者のプロトコルに従って、SuperScript<sup>TM</sup> II RTaseおよびoligo-(dT) 12-18プライマー (I n v i t r o g e n) を用いて行われた。総量  $20 \mu\text{l}$  のRT反応混合液のうち  $1 \mu\text{l}$  を、各リアルタイムPCR反応のためのテンプレートとして使用した。プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブは、Primer 3 software (HYPERLINK "[http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)") を使用して設計し、合成した (H o k k a i d o   S y s t e m   S c i e n c e) 。このプローブを、5' 末端でレポーター色素、また3' 末端でクエンチング剤を結合させるように改変した。そのオリゴヌクレオチドの配列は、m $\beta$ -アクチン (順方向: 5' - g g c c a g g t c a t c a c t a t t g g - 3'、逆方向: 5' - a t g c c a c a g g a t t c c a t a c c - 3'、プローブ: 5' F a m - t c a g g g c a t c g g a a c c g c t c - T a m r a 3' )、mIL-6 (順方向: 5' - c t t c a c a a g t c g g a g g c t t a a - 3'、逆方向

: 5' - c a g a a t t g c c a t t g c a c a a c - 3' 、プローブ: 5' F a m - t c a t t t t c c a c g a t t t c c c a g a g a a c a - T a m r a 3' ) 、 m I L - 1 0 ( 順方向: 5' - c c t g g g t g a g a a g c t g a a g a - 3' 、逆方向: 5' - g c t c c a c t g c c t t g c t c t t a - 3' 、プローブ: 5' F a m - a a t c g a t g a c a g c g c c t c a g c c - T a m r a 3' ) および T N F  $\alpha$  ( 順方向: 5' - c c a g a c c c t c a c a c t c a g a t c - 3' 、逆方向: 5' - c a c t t g g t g g t t t g c t a c g a - 3' 、プローブ: 5' F a m - a a t t c g a g t g a c a a g c c t g t a g c c c a c - T a m r a 3' ) 、である。ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) は、 L i g h t C y c l e r ( 登録商標 ) ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) を使用して前述された ( Stordeur, P. et al. J. Immunol. Method. 259 55-64 (2002) ) ように行った。簡単には、 F a s t S t a r t D N A M a s t e r H y b r i d y s a t i o n P r o b e s ( 2  $\mu$  l ) ( R o c h e D i a g n o s t i c s ) 、 1  $\mu$  l のハイブリダイゼーションプローブ ( 4 p m o l /  $\mu$  l ) および適切な濃度の順方向プライマーおよび逆方向プライマーを用いて、最終体積 2 0  $\mu$  l の反応混合液になるようにした。最初の変性工程 ( 9 5  $^{\circ}$  C にて 1 0 分間 ) の後、温度サイクル ( 9 5  $^{\circ}$  C にて 0 秒、 6 0  $^{\circ}$  C にて 2 0 秒 ) を開始した。計 4 5 サイクル行った。各サイクルの終わりに、 F 1 / F 2 を用いてフルオレセインを読み取った。全ての増幅を 3 回行って、標準曲線からの計算値によって定量した。全ての結果は、  $\beta$  - アクチンに対して標準化した。

#### (VI) T細胞増殖アッセイ

R A G - 1 欠損 ( Corbela, P. et al. Immunity 1, 269-276 (1994) ) を有する D<sup>b</sup> 拘束 N P 366-374 特異的 T C R トランスジェニックマウス ( F 5 ) に由来する未反応 T 細胞を、ナイロンウールカラムを用いて精製した。 T 細胞 ( 2  $\times$  1 0<sup>5</sup> / ウェル ) を、各 D C サブセット ( 5  $\times$  1 0<sup>5</sup> / ウェル ) と共に 3 日間培養した。その応答を <sup>3</sup> H - チミジンの取り込みによって測定した。脱活性化 D C のアナジー誘導能力をみるために、 K<sup>b</sup> 限定 O V A 257-264 特異的 T 細胞クローン ( 1  $\times$  1 0<sup>6</sup> / ウェル ) ( 4 G 3 ; Sykulev, Y. et al. Proc Natl. Acad. Sci. U S A 91, 11487-11491 (1994) ) を、脱活性化 D C ( 1  $\times$  1 0<sup>5</sup> / ウェル ) と共に、 1

0  $\mu$ l OVA<sub>257-264</sub>の存在下で、24ウェルプレート中で2日間培養した。次いで、4G3細胞 ( $1 \times 10^5$ /ウェル) を洗浄し、滴定された (t i t t a t e d) 濃度のOVA<sub>257-264</sub>ペプチドと共にマイトマイシンCで処理した脾臓細胞 ( $2 \times 10^5$ /ウェル) (抗原提示細胞として) と共に培養した。これらの応答は、<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによって測定した。

(VII) 生体内におけるDC成熟アッセイ

OD11.10マウス (Murphy, K. A. et al. Science 250, 1720-1723 (1990)) の4本の足全てに、 $1 \times 10^7$  CFDA-SE (M o l e c u l a r p r o b e s) 標識されかつLPS刺激されたDC (OVA<sub>257-264</sub>ペプチド (H o k k a i d o S y s t e m S c i e n c e) を適用した、またはこれを適用していない) を皮下注射した。注射の2日後、リンパ節および脾臓を、分解能の低いコラゲナーゼを用いて37℃で30分間消化した。次いで、CFSE陽性細胞を抗-CD86抗体で染色し、前述のように解析した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 成熟時における骨髓性DCのCD86発現の時間経過

a、C57BL/6骨髓細胞に由来する未成熟DCは、抗-CD40 mAb、LPSまたはTNF $\alpha$ と共に培養され、次いで8時間および24時間後フローサイトメトリーを用いてに解析された。細胞を抗-CD11c-FITC、抗-CD86-PEおよびヨウ化プロピウム (PI) で染色した。これらの事象は、CD11c<sup>+</sup>およびPI<sup>low</sup>においてゲートされた (g a t e d) 。 b、LPS刺激の6時間後、CD11c<sup>+</sup>DCを磁気選別によって分離し、LPSまたは抗-CD40 mAbの存在下あるいは非存在下において、24時間培養した。細胞を抗-CD86-PEおよびPIで染色し、PI<sup>low</sup>集団上でゲートされた。生存率は85.3% (培地コントロール)、85.8% (LPS) および89.7% (抗-CD40) であった。 c、2次刺激後の2つの異なるDC集団によるCD発現のパターン。未成熟DCを、それぞれ、LPSまたは抗-CD40 mAbを用いて48時間刺激し、次いでそれぞれLPSまたは抗-CD40 mAbを用いてさらに24時間再刺激し。これらのデータは、類似した結果を有する2回以上の独立した実験の代表である。

**【図2】成熟時における骨髓性DCの表現型的分析**

a、4種類の異なるDCサブタイプの細胞形態学：未成熟DC（刺激されていない）、M1DC（LPSと共に6時間培養）、脱活性化DC（LPSと共に24時間培養）およびM2DC（抗-CD40 mAbと共に24時間培養）。  
b、LPSもしくはCD40刺激後6時間もしくは24時間における、(B6×C3H) F1マウス由来の未成熟DCのDC86、MHCクラスI（H-2K<sup>k</sup>）、MHCクラスII（H-2A<sup>k</sup>）およびFcγRII/IIIIの発現パターン。  
c、未成熟DC（白色の図）もしくは脱活性化DC（灰色の図）のTLR4/MD2の発現レベルにおける差異。  
d、未成熟DC、脱活性化DCおよびM2DCの食作用能力。FITC標識ビーズを、8時間共培養にかけた。これらのデータは、類似する結果を有する独立する3回の実験の代表である。

**【図3】DCサブユニットのサイトカイン産生プロフィール**

未成熟DC、M1DC、脱活性化DCおよびM2DC（タイプ2）、もしくはLPSおよび抗-CD40 mAbで連続的に刺激されたM2DC（タイプ1）を細胞分類によって精製した。a、未成熟DC（1）、M1DC（2）、M2DC（3）、および脱活性化DCのRNaseプロテクションアッセイ。  
b、4つの異なるDCサブセット（未成熟DC（1）、M1DC（2）、M2DC（3）、および脱活性化DC）ならびにLPSおよび抗-CD40 mAbで連続的に刺激されたDC（5）におけるIL-6、IL-10、およびTNFαのmRNAレベルの、リアルタイム定量的PCRによるRT-PCR分析。コピー数は、β-アクチンに対して標準化された。これらの結果は、類似する結果を有する独立する3回以上の実験の代表である。

**【図4】DCサブセット機能的分析**

a、F5マウス由来の未反応CD8<sup>+</sup>T細胞を、数種類の異なる濃度のNP366-374を適用させた以下のDCサブセットと共に48時間共培養した：未成熟DC（黒色の図）、脱活性化DC（灰色の図）、M2DC（白色の図）。このデータは、類似する結果を有する4つの独立する実験の代表である。  
b、OVA<sub>257-264</sub>/K<sup>b</sup>特異的T細胞クローン（4G3）を、脱活性化DCおよびOVA<sub>257-264</sub>（10 μM）と共に48時間共培養し、次いでペプチド適用されたMMC処理済

B6 脾臓細胞（滴定濃度）と共にさらに24時間培養し、その応答を測定した。これらのデータは、類似する結果を有する独立する2回の実験の代表である。

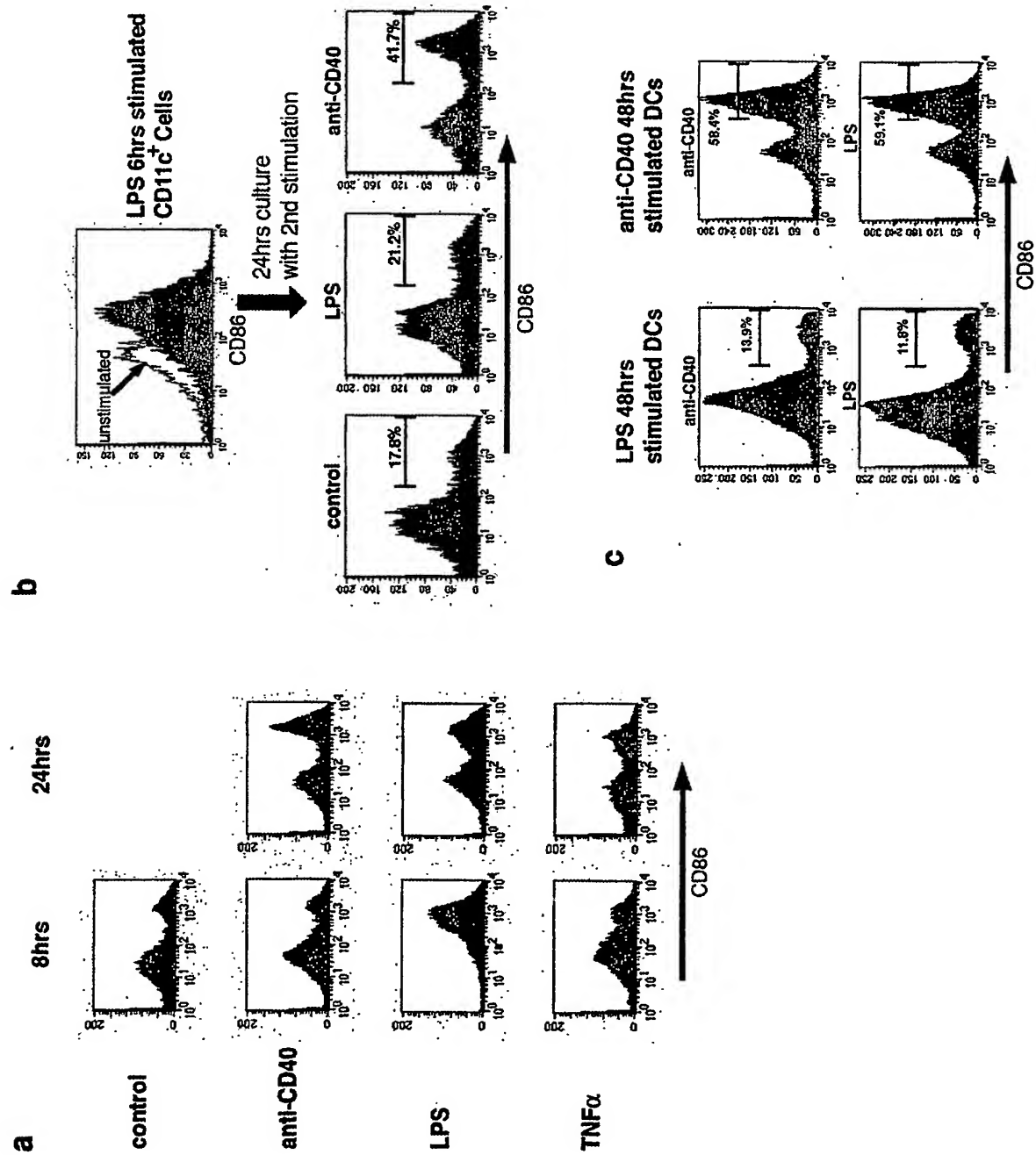
【図5】生体内におけるDCの分化および成熟

a、LPS刺激された未成熟DCをCFDA-SEで標識し、D0.11.10マウスへ注射（OVA323-339有りまたは無し）した。48時間後、リンパ節（LNs）および脾臓（SPL）中のDCを抗-86抗体で染色した。CFSE陽性細胞を分析した。これらの結果は、類似する結果を有する独立する3回の実験の代表である。 b、未成熟DCを、ペプチドグリカンIII型、CpG ODNもしくは壊死細胞派生物、LPS、または抗-CD40 mAbで刺激した。そのDCを、刺激の6時間（白色の図）および48時間（灰色の図）後、CD86について染色した。これらのデータは、類似する結果を有する独立する2回の実験の代表である。 c、骨髓性DC成熟のモデル。TLRを介して微生物シグナルによって刺激された未成熟DCは、直ぐに、MHCクラスIIおよび副刺激分子を発現するM1DCへと変化する。M1DCは、CD40Lを有するTh細胞と結合し、CD40からシグナルを受けてM2DCへ連続的にシフトし、成熟表現型を維持する。CD40の刺激が無い場合、M1DCは、ダウンレギュレーションされたMHCクラスIIおよび副刺激分子を有する脱活性化DCへと成長する。

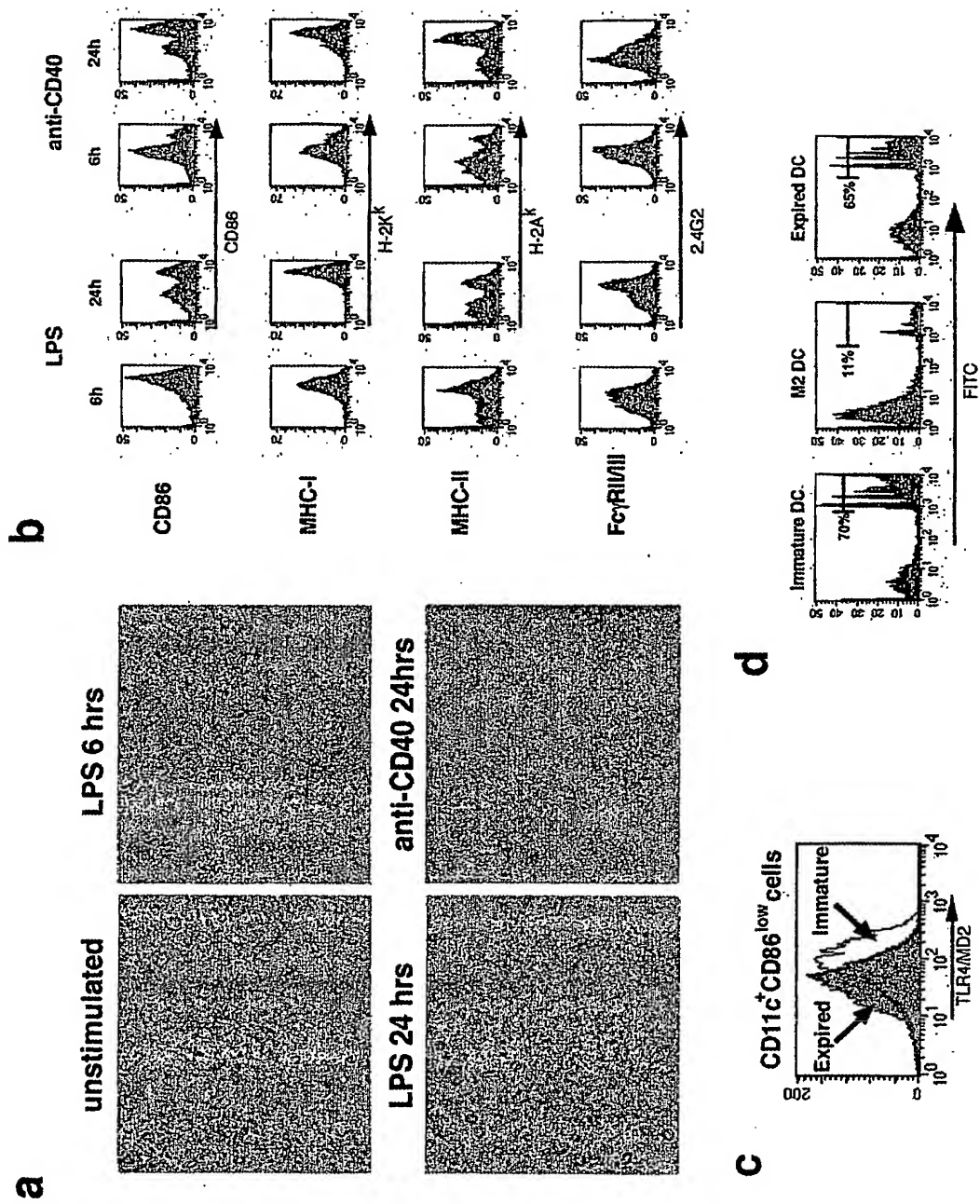
。

【書類名】 図面

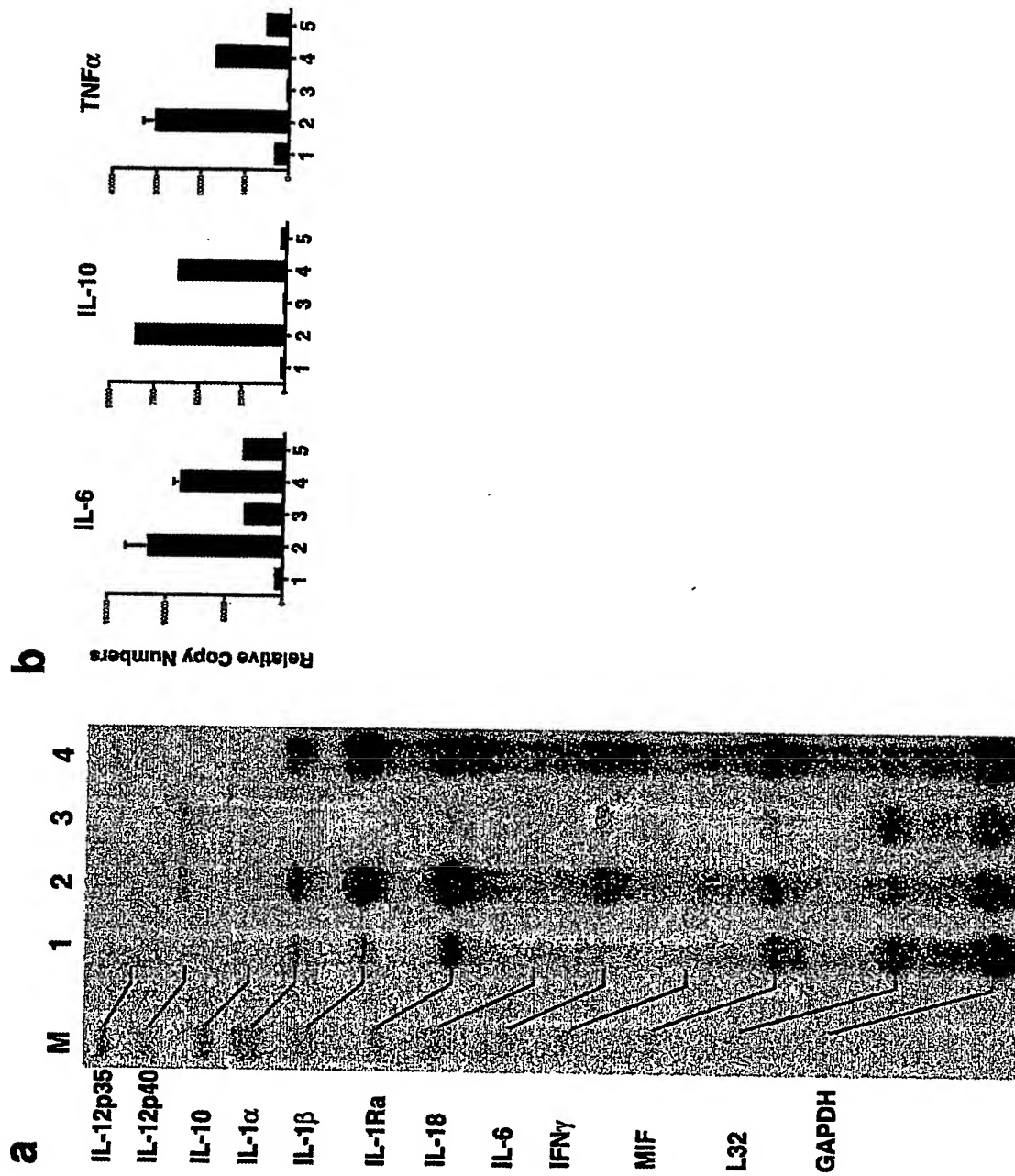
【図 1】



【図 2】



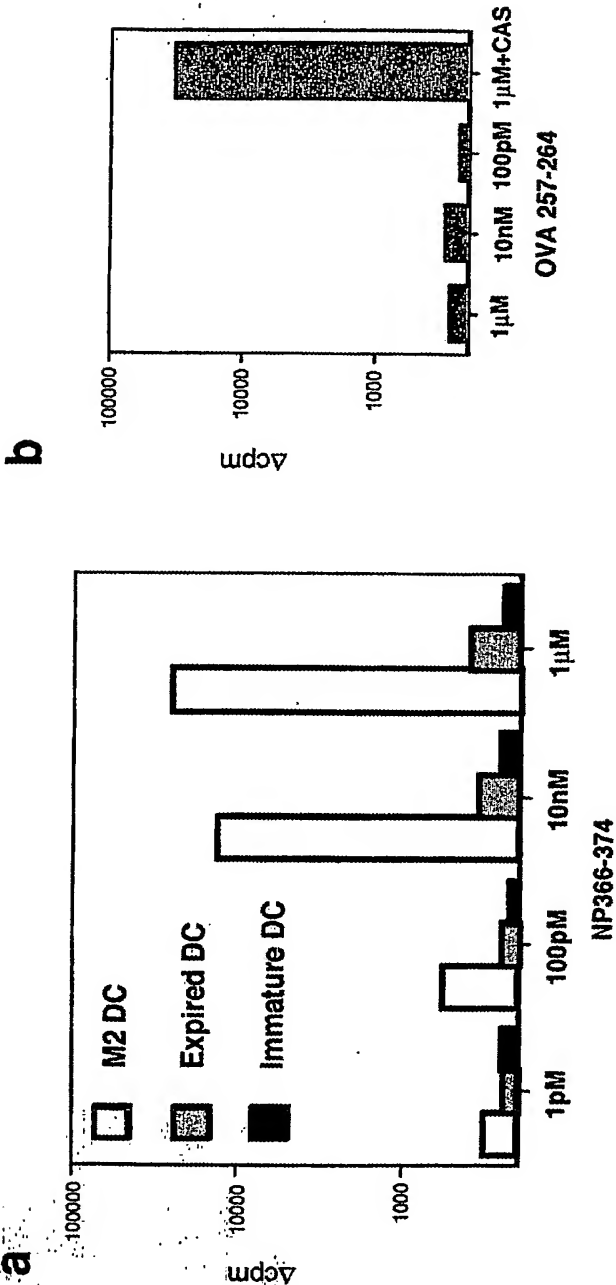
【図 3】



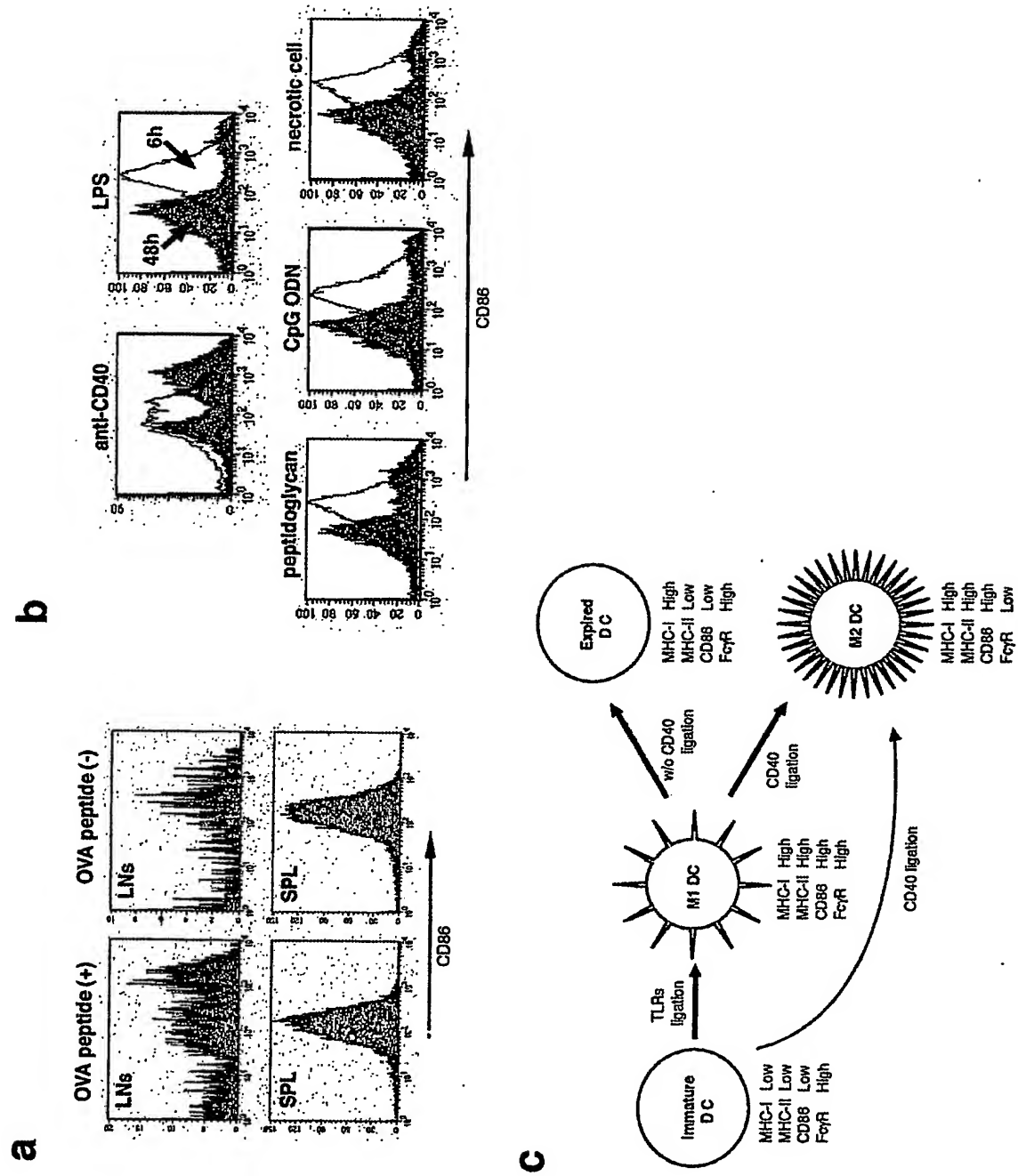


【図 4】

ogasawara\_fig.4



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫抑制作用に関与する樹状細胞を提供する。

【解決手段】 以下の（１）、（２）の特徴を有する脱活性化した樹状細胞（expi red dendritic cell；以下「脱活性化DC」と略記する。）：

- （１） L P S 及び抗 C D 4 0 m A b の作用により成熟型に移行しない
- （２） 未成熟樹状細胞と同様の形状を有する

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 0 0 8 8 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 8 9 9 0 0 0 0 4 6 ]

1. 変更年月日 2 0 0 2 年 8 月 2 日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市下京区中堂寺栗田町 9 3 番地  
氏 名 関西ティー・エル・オー株式会社